

論文の内容の要旨

論文題目 非小細胞肺癌における新規癌遺伝子の検索

氏名 川上 正敬

肺癌は世界中で診断される臓器別の癌の中では最も多く、死亡者数も男性では臓器別で第一位、女性では第二位である。従来は肺癌に対する化学療法として、病理組織学的な分類に基づいて殺細胞性抗癌剤が用いられてきたが、予後改善への寄与はわずかであると言わざるを得ない。しかし近年は、特定のシグナル伝達分子などを標的とした低分子化合物や抗体を用いた分子標的療法が臨床に供されるようになり、その状況は徐々にではあるが変わりつつある。

肺癌での分子標的薬の代表例としては、チロシンキナーゼ (TK) ファミリーの一つである EGFR の阻害薬がある。肺癌患者の一部は EGFR 遺伝子変異を持ち、これらの遺伝子変異と EGFR 阻害薬の臨床効果に密接な関連があることが示され、現在は EGFR 遺伝子変異の有無が化学療法剤の選択に重要な要素となってきた。最近では、同じく TK ファミリーの一つである ALK 遺伝子が EML4 遺伝子と融合遺伝子を形成することで恒常的に活性化し、一部の肺癌患者の発癌に寄与していることがわかった。これらの患者に対しては ALK 阻害薬が治療薬として良好な結果を得られている。こうした成果を受け、今日では肺癌診療においても分子生物学的な視点がますます重要となり、新たな治療標的分子の検索も精力的に行われるようになってきている。

今回私は、肺癌において ALK 遺伝子のように融合遺伝子形成などにより恒常的に活性化し発癌に関与する遺伝子が他にも存在する可能性を考え、ヒト非小細胞肺癌で活性の亢進している遺伝子をバイオインフォマティクスの手法と実験的手法を組み合わせることで網羅的に検索し、最終的に一部の症例で TK ファミリーの一つである FER 遺伝子が融合遺伝子を形成していることを発見した。

まず、強い発癌性が示されている ALK 遺伝子の TK ドメインと相同性の高い遺伝子をアメリカ生物情報センター(NCBI)の tblastn アルゴリズムを用いて抽出し、上位 36 遺伝子を候補遺伝子とした。これらの遺伝子は全て TK ファミリーの遺伝子であった。これらの候補遺伝子について、その存在のみで癌

化の十分条件とされる EGFR 変異や KRAS 変異を持たない非小細胞肺癌 30 症例で、正常肺組織と比べた過剰発現の有無を TK ドメインでの定量的 RT-PCR により検討したところ、いくつかの遺伝子が肺癌症例で発現増大していることがわかった。次にこれらの過剰発現している遺伝子について、5'側に新たにプライマーを設計し定量的 RT-PCR を行い、TK ドメインの発現量との解離の有無を調べた。これは、解析したいずれの TK 遺伝子も TK ドメインは3'側にあり、もしその TK 遺伝子が融合遺伝子を形成して5'側が別の遺伝子に置き換わっているとすれば、5'側に置いたプライマーでの定量的 RT-PCR では発現量は増大していない（あるいは低下している）ことが予想され、過剰発現している TK ドメインの発現量と解離を認めるはずであると考えたからである。その結果 FER 遺伝子を含む 8 遺伝子で解離を認め、これらの遺伝子についてその 5'側の配列を同定するため rapid amplification of cDNA ends (RACE) を施行した。ほとんどの遺伝子では、正常型の全長遺伝子のみが検出されるなど有意な産物を得られなかったが、FER 遺伝子について RACE を施行した 2 症例のうち 1 症例で 5'側が PJA2 遺伝子に置き換わり、PJA2 遺伝子のエクソン 1 が FER のエクソン 14 以下の 3'側に融合した PJA2-FER 融合遺伝子が同定された。本来 PJA2 遺伝子と FER 遺伝子はヒト 5 番染色体長腕内に互いに反対向きに存在する。従って、PJA2-FER 融合遺伝子が生じるためには 5 番染色体長腕内で逆位を形成したと予想される。

PJA2 側から下向きにフォワードプライマーを、FER 側から上向きにリバースプライマーを設計し、PCR を行うことで PJA2-FER 融合遺伝子のさらなる検索を施行したところ、最初に同定されたパターンの他にもいくつかの融合パターンが検出された。この中には、PJA2 のエクソン 1 が FER のエクソン 3 以下に融合したタンパクとしてはインタクトな FER タンパクそのものが翻訳されるであろう融合パターンもあった。肺癌細胞株でも検索したところ、NCI-H661 細胞において、臨床症例と同様に PJA2-FER 融合遺伝子が同定され FER が他の肺癌細胞株と比べ過剰発現していた。

PJA2 遺伝子の生体での機能はほとんどわかっていないが、既知のマイクロアレイデータではほとんどの正常組織で高い発現を示しており、そのプロモーター活性は強いことが予想される。実際に定量的 RT-PCR を施行したところ PJA2 の発現量は、検討した肺や肝臓、横紋筋などを含む 20 の正常組織の全てで FER の 10 倍かそれ以上であることが確認された。このことから FER は PJA2 と融合し活性の強い PJA2 プロモーターを利用することにより過剰発現することが考えられた。

次に、FER 遺伝子の機能解析をした。まず、今回同定された融合遺伝子について発現ベクターを作

成し NIH-3T3 細胞に導入したところ、インタクトな全長 FER タンパクが翻訳されるパターンの融合遺伝子の発現ベクターを導入した細胞では contact inhibition の消失を示唆する focus formation が多数観察され、FER 遺伝子の癌化能が確認された。続いて、H661 細胞の FER ノックダウンによる変化を調べた。H661 細胞は前述のように、PJA2-FER 融合遺伝子を有し FER の過剰発現を認め、FER 過剰発現肺癌症例のモデルとして捉えることができる。FER ノックダウンのため、最初に FER に対する siRNA プラスミドベクターを 5 種類作成した。これを H661 細胞に導入し FER ノックダウン効果を確認したところ、ウェスタンブロットによるタンパクレベルでの評価でも、定量的 RT-PCR による mRNA レベルでの評価でも、FER ノックダウン効果を確認できた。このうち、ノックダウン効果の最も顕著であった 2 つを選び実験に使用することにした。この 2 つの siRNA ベクターに対しては、コントロールとしてそれぞれスクランブルベクターを作成した。作成後、スクランブルベクターを H661 細胞に導入しても、FER の発現量の低下を認めないことを確認した。これらの siRNA ベクター及びスクランブルベクターを H661 細胞に導入し解析したところ、FER siRNA ベクターではアポトーシスが誘導されたが、スクランブルベクターでは変化はなかった。対照実験として、FER の過剰発現のない A549 細胞に FER siRNA ベクターを導入したが、細胞増殖に変化はなかった。これらのことから、FER を過剰発現している癌細胞では FER ノックダウンにより細胞死が誘導されることが示された。

最後に FER 過剰発現のある肺癌症例の頻度を調べた。肺癌症例の tissue microarray を FER 抗体で免疫染色したところ、肺腺癌症例の 45.3% (107/236 例)、肺扁平上皮癌の 23.6% (30/127 例) で FER 免疫染色陽性、即ち FER の過剰発現を認めた。この過剰発現をもたらす機序として、PJA2-FER 融合遺伝子における PJA2 遺伝子の強いプロモーター活性の利用による過剰発現の他にも、例えば遺伝子増幅などの機序も存在する可能性が考えられた。また、融合遺伝子による機序であっても、パートナー遺伝子はプロモーター活性の強い遺伝子でありさえすれば FER は過剰発現できることが予想され、必ずしも PJA2 遺伝子である必要はないと考えられる。実際、FER 免疫染色で陽性であった症例について PJA2-FER 融合遺伝子を検出するプライマーによる PCR 法で検索したところ、FER 免疫染色陽性肺癌において PJA2-FER 融合遺伝子が検出されたのは、肺腺癌のうち 53% (18/34 例)、肺扁平上皮癌のうち 67% (6/9 例)であった。免疫染色陽性であったにも関わらず PJA2-FER 融合遺伝子が検出されなかった残りの症例では、PJA2-FER 融合遺伝子以外の機序で FER が過剰発現していると予想された。

以上、今回私は肺癌における新たな癌遺伝子の同定を目指し肺癌症例を網羅的に検索することにより、一部の症例で TK ファミリーの一つである FER 遺伝子が融合遺伝子を形成し過剰発現していることを発見した。また、同様の遺伝子再構成を認める肺癌細胞株も同定し、これをモデルとした機能解析から、FER 過剰発現を認める肺癌に対する治療として FER を阻害することの有効性を示した。これまでの報告で FER のノックアウトマウスは正常に発育することがわかっており、FER 阻害薬は治療薬として重篤な有害事象は少ないことが期待され、FER は肺癌分子標的治療の新たな有力な標的となりうると考えられた。